

# Una nueva era de la biotecnología en el mejoramiento genético

Laura Méndez\*  
Giovanni Garro\*\*  
ggarro@itcr.ac.cr

El mejoramiento genético de cultivos es una práctica que el hombre ha llevado a cabo desde hace miles de años, con el fin de obtener cosechas que permitan satisfacer las necesidades de las poblaciones humanas (Cravero *et al.* 2011). Durante este tiempo han predominado las técnicas de mejoramiento genético convencional como la selección artificial y los cruzamientos.

Sin embargo, en los últimos 30 años también se han desarrollado metodologías que hacen uso de la biotecnología moderna, con las cuales se obtienen plantas con características deseadas en menor tiempo por medio del uso de la ingeniería genética. Más recientemente se está generando una nueva era del mejoramiento genético por medio de las técnicas de edición génica que generan cambios precisos y controlados (edición) de las secuencias génicas a partir de un sistema de enzimas de restricción. Este sistema se espera genere una nueva revolución biotecnológica y aportes sustanciales al desarrollo de cultivos y alimentos.

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, por su traducción del inglés), funciona naturalmente como un sistema inmune adaptativo microbiano para protegerse de ADN exógeno. Este fue descrito por primera vez en 1987, y se ha descubierto que puede facilitar la manipulación de genomas eucariotas, obteniendo cambios en sitios específicos del ADN para generar organismos con características deseadas (Ran *et al.* 2013).

El sistema CRISPR/Cas se basa en el almacenamiento de pequeños segmentos de ADN de otros organismos, que son usados

como memoria y que le permiten a la célula defenderse de nuevos ataques. Cuando la bacteria o arquea es atacada por ADN exógeno (viral o plasmídico), la maquinaria celular interna corta el ADN e integra un segmento de este en el locus CRISPR.

Actualmente han sido identificados tres tipos de sistemas de CRISPR (I-III); cada uno de estos consiste en una agrupación de genes asociados a CRISPR (genes Cas), ARNs no codificantes y un conjunto distintivo de elementos repetitivos (repeticiones directas). Estas últimas se encuentran interesparadas por secuencias variables (espaciadores) correspondientes a los segmentos genéticos foráneos (Hwang *et al.* 2013; Ran *et al.* 2013; Hsu *et al.* 2014).

Posteriormente, sucede la transcripción del locus CRISPR, generando pre-ARNcr que seguidamente es procesado para obtener ARNs CRISPR (ARNcr) cortos, los cuales funcionan como ARNs guía (Figura 1). Estos se unen por complementariedad de bases al ADN foráneo y señalan el sitio específico del ADN a cortar por las proteínas Cas (Hwang *et al.* 2013).

Las proteínas Cas son endonucleasas que utilizan los ARNcr como guía para introducir un corte en la doble hebra de ADN en un sitio específico. La investigación del sistema CRISPR/Cas, ha permitido desarrollar ARNs guías sintéticos que poseen un extremo 5' que se une al ADN blanco, y un extremo 3' que se acopla con la proteína cas (Doudna & Charpentier, 2014); esto

con el fin de editar genes específicos en un organismo determinado.

Los mecanismos de reparación de la célula se activan en respuesta al corte que realiza la endonucleasa cas lo que puede ocasionar la pérdida o adición de información genética en la región del genoma que se desea editar (Castillo, 2016). Se han definido dos vías diferentes mediante las cuales puede ser reparada la ruptura en la doble banda del ADN: la unión de terminales no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). En la mayoría de los casos NHEJ causa inserciones o deleciones (*indels*) al azar, lo que puede resultar en mutaciones en el marco de lectura si ocurren en la región codificante de un gen, lo que genera una pérdida de la función original del gen o su silenciamiento (Bortesi & Fischer, 2015). Cuando se adiciona una molécula de ADN molde homóloga a la región que se quiere editar, el ADN dañado puede ser reparado mediante HR, por lo que este mecanismo puede ser utilizado para lograr modificaciones genéticas precisas o para inserción de genes (Bortesi & Fischer, 2015; Castillo, 2016).

La introducción del sistema CRISPR/Cas a la célula se realiza mediante la incorporación de un plásmido que contenga la secuencia de la endonucleasa cas, junto con el ARN guía específico del gen que se desea modificar. El sistema puede ser aplicado a diferentes organismos, es barato (en comparación con otros sistemas similares) y es altamente específico.

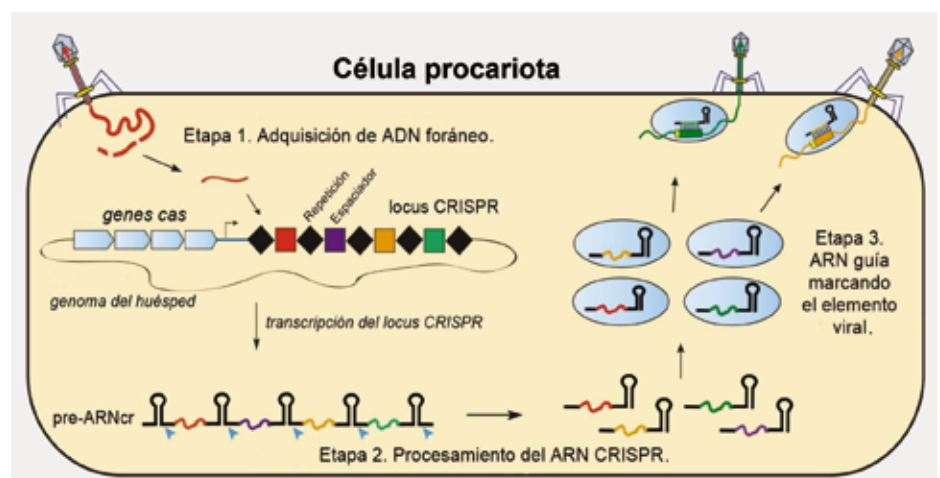


Figura 1. Representación del sistema CRISPR/Cas en bacterias y arqueas. Adaptado de: The Doudna Lab 2017.

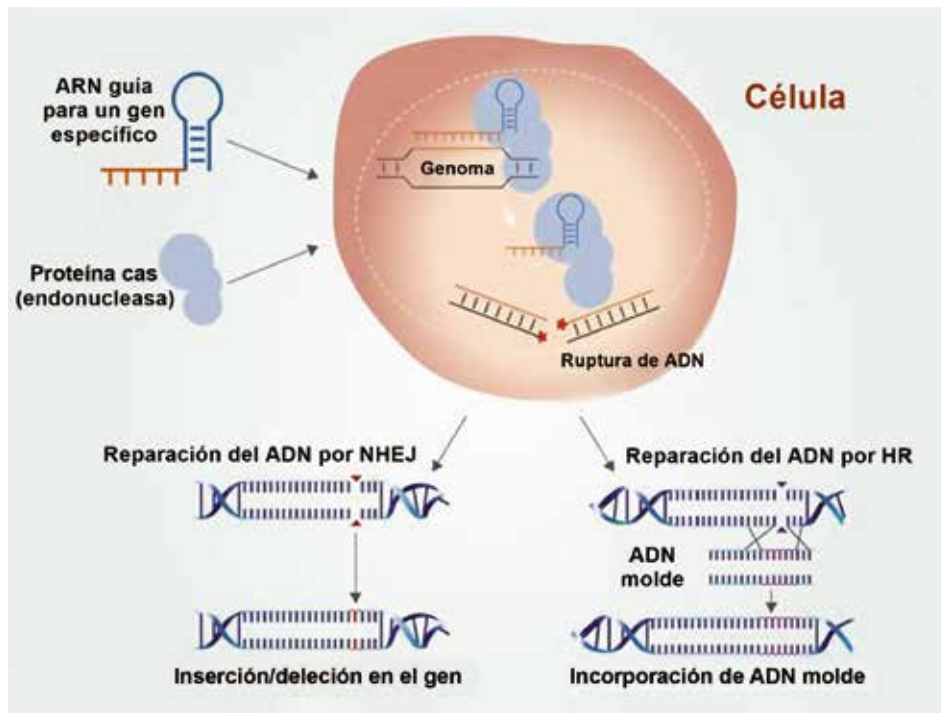


Figura 2. Edición de genes por el sistema CRISPR/Cas usando los mecanismos de reparación de unión de terminales no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga. Adaptado de: Castillo, 2016.

Entre las principales aplicaciones de esta tecnología se destacan casos como la obtención de un arroz con alto contenido de amilosa, en el cual se utilizó el sistema CRISPR/Cas para generar mutaciones dirigidas en los genes SBEI y SBEII del arroz. Como resultado, se obtuvieron líneas con inserciones/deleciones en los genes SBEI y SBEII, favoreciendo el aumento en los contenidos de amilosa y almidón resistente, los cuales son considerados como beneficiosos para la salud humana (Sun *et al.* 2017). Además, CRISPR/Cas también puede ser aplicado en humanos. Recientemente se publicó un artículo, en el cual se reporta que el sistema CRISPR/Cas9 puede corregir de manera eficiente y segura una mutación en el gen MYBPC3 en embriones humanos. Las mutaciones en este gen pueden causar miocardiopatía hipertrófica, la cual es una causa común de insuficiencia cardíaca en pacientes que llevan esta mutación. Ma *et al.* (2017) diseñaron un constructo que contenía las secuencias de un ARN guía y de la enzima Cas9, de forma que obtuvieron la edición dirigida del gen, logrando eliminar la mutación y sin obtener otras mutaciones no deseadas.

De esta forma se puede esperar que el sistema CRISPR/Cas siga en aumento de utilidad por su alta eficiencia y versatilidad en diversos sistemas biológicos generando aportes al mejoramiento genético de cultivos y alimentos en la nueva era genómica.■

#### Referencias bibliográficas

- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52.
- Castillo, A. (2016). Edición de genes para el tratamiento del cáncer de pulmón (CRISPR-Cas9). *Colombia Médica*, 47(4), 178-181.
- Cravero, V.P., López Anido, F.S., Espósito, M.A., & Cointy, E.L. (2011). Mejoramiento convencional y no convencional de especies hortícolas. *BAG. Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1), 0-0.
- Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213), 258096. Recuperado de <http://science.sciencemag.org/content/346/6213/258096>
- Hsu, P.D., Lander, E.S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., ... & Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a

CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229.

- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A., Kim, D., Kim, S., Gong, J., Gu, Y., Xu, X., Battaglia, D., Krieg, S., Lee, D., Wu, D., Wolf, D., Heitner, S., Belmonte, J., Amato, P., Kim, J., Kaul, S. and Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668), pp.413-419.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X. & Xia, L. (2017). Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- The Doudna Lab. 2017. Recuperado de: <http://rna.berkeley.edu/crispr.html>

\*Laura Méndez es estudiante de último año de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

\*\*Giovanni Garro es profesor catedrático e investigador de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.